

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成9年度博士課程進学

氏名 田中 純

指導教官 岩倉洋一郎

### 論文題目

**Mechanism of LPS-induced HIV-1 gene activation in mice transgenic for HIV-1**  
(トランスジェニックマウスを用いた LPS による HIV-1 遺伝子活性化機構の解析)

### 序 論

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) は後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスとして知られている。HIV-1 に感染すると、数週間の初期症状の後約 10 年にわたる長い潜伏期に入る。この間、外見上変化は認められないが末梢血中の CD4+T 細胞数は徐々に減少していき、それに伴う免疫機能の低下により、最終的に各種日和見感染症や脳症を呈し AIDS 発症に至る。AIDS 発症に至る病態進行と血中ウイルス量の増加には相関関係が認められており、HIV-1 の発現を抑制することが AIDS 発症を防ぐ有効な手段になると考えられるが、現在の治療法では潜伏感染状態にある HIV-1 を完全には除去できず、またその活性化機構に関しても未だ不明な点が多い。それは HIV-1 遺伝子の発現が生体、特に宿主免疫系との複雑な相互作用の下で制御されているため、HIV-1 遺伝子活性化機構の解析は *in vitro* の系のみでは不可能であり、適当な動物モデルが必要であることが原因の一つとなっている。そこで私は、HIV-1 遺伝子活性化機構を *in vivo* で解析するために、当研究室にて作成された HIV-1 トランスジェニックマウス (以下 HIV マウス) を用いて以下の解析を行った。

HIV マウスは HIV-1 NL4-3 株全長を含むトランスジェニックマウスであり、HIV-1 遺伝子の発現は HIV-1 のプロモーターである HIV-1 LTR により制御される。従って、HIV マウスにおける HIV-1 遺伝子の発現はウイルス本来の発現誘導機構により制御されると考えられる。

## 第一章

HIV-1 遺伝子の発現は、UV、菌体成分、ウイルス成分、サイトカイン等様々な物質により亢進することが *in vitro* において示されている。この中で特に、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IFN- $\gamma$ などのサイトカインが生体内での HIV-1 遺伝子活性化に重要な役割を果たしていると考えられており、AIDS 患者の血中ではこれらサイトカインのレベルが上昇していることが知られている。しかしながら、これらのサイトカインが生体内で HIV-1 発現亢進に関与しているという直接的な証拠はこれまでのところ示されていない。そこで HIV マウスを用いて、HIV-1 遺伝子活性化に対する TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IFN- $\gamma$ の影響について検討した。

HIV マウスの免疫系を刺激するために、実験には各種サイトカインを強力に誘導することが知られている、グラム陰性菌の細胞外膜成分であるリポポリサッカライド (LPS) を用いた。無刺激時の HIV マウスリンパ系組織においては、HIV-1 遺伝子の発現は弱いながらも脾臓、胸腺、リンパ節で検出された。この HIV マウスに LPS を腹腔内投与したところ、48h 後の HIV-1 遺伝子の発現は脾臓において十数倍、リンパ節で 2~3 倍亢進した。また LPS 投与時の血中 p24 Gag タンパク質濃度は AIDS 患者とほぼ同等のレベルにまで上昇し、血中には約  $1 \times 10^6$  particles/ml のウイルス粒子が存在していた。したがって HIV マウスにおいては、HIV-1 プロウイルスから HIV-1 ウイルス粒子が効率的に産生されていると考えられた。

HIV マウス脾臓における HIV-1 遺伝子の発現は、LPS 投与後徐々に上昇し 48 時間後にピークを迎えその後減少するが、この時 HIV-1 遺伝子活性化に先行して TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ などのサイトカインの発現が誘導されていた。そこで TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha/\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 各種サイトカイン遺伝子欠損マウスを HIV マウスと交配することにより、各種サイトカイン遺伝子欠損 HIV マウスを作成し、LPS 投与時の HIV-1 遺伝子活性化レベルを比較した。その結果、TNF- $\alpha$  および IL-1 $\alpha/\beta$ 遺伝子欠損 HIV マウスの脾臓では、LPS 投与時の HIV-1 mRNA 発現が野生型マウスに比べそれぞれ 40%および 60%に低下していた。これに対し、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  遺伝子欠損 HIV マウスでは差はみられなかった。この結果、LPS 刺激による HIV-1 遺伝子の活性化には主として TNF- $\alpha$ や IL-1 が関与していることがわかった。

## 第二章

潜伏感染状態にある HIV-1 が、生理的刺激によりどのように再活性化されるかに関しては

よくわかっていないが、古くから、レトロウイルスについてはクロマチンに挿入されたプロウイルスの不活性化に DNA のメチル化が関与していることが示唆されている。HIV-1 に関しても、*in vitro* の研究から HIV-1 LTR のメチル化が HIV-1 LTR のプロモーター活性を抑制することが示されているが、HIV-1 遺伝子の再活性化とメチル化に関してはこれまで検討されていない。そこで HIV-1 が潜伏感染状態にある HIV マウスを用いて、メチル化・脱メチル化状態が HIV-1 遺伝子活性化にどのように関与するかについて検討した。

まず、HIV マウスのリンパ球を脱メチル化剤である 5-Azacytidine (5-AzaC) 存在下、非存在下にて LPS 刺激した際の HIV-1 遺伝子発現を比較した。48 時間 LPS 刺激後の HIV-1 mRNA 発現は無刺激培養時と比較して約 10 倍亢進するが、この時 LPS に加え 5-AzaC を添加したところ、LPS 単独刺激と比較して HIV-1 mRNA の発現および培養上清中の p24 Gag たんぱく質量が 10 倍~20 倍上昇していた。In vitro にて LPS 刺激したリンパ球中の HIV-1 遺伝子発現が 5-AzaC による脱メチル化により亢進することから、*in vivo* で LPS 投与により誘導された HIV-1 遺伝子活性化にも脱メチル化が関与している可能性が考えられた。そこで HIV マウス脾臓細胞における HIV-1 LTR のメチル化が、無刺激時と LPS 投与時でどのように変化するかを検討したところ、無刺激時では HIV-1 LTR にある 7ヶ所の CpG 部位全てがメチル化されていたのに対し、HIV 遺伝子が活性化される LPS 投与後 48 時間においては、HIV-1 LTR にある 7ヶ所の CpG のうち 5' 側から 5 番目の CpG 部位が脱メチル化されている傾向にあった。これらの結果から、HIV マウスにおける LPS による HIV-1 遺伝子活性化には、HIV-1 LTR の脱メチル化が関与している可能性が考えられた。

CpG 部位の脱メチル化には 2つのメカニズムが考えられている。1つはメチル化されている CpG 部位を直接脱メチル化するメカニズムであり、もう一つは DNA 複製時に新たに合成された DNA 鎖が維持メチル化酵素によりメチル化されるのを阻害することにより脱メチル化するメカニズムである。この 2つのメカニズムの相違は脱メチル化に DNA 複製または細胞周期の進行が関与しているかどうかである。そこで LPS 刺激時の HIV-1 遺伝子活性化に細胞周期の進行が関与しているかどうかについて検討した。HIV マウスの脾臓細胞を予め細胞内蛍光色素である CFSE で染色しておき、LPS 刺激時における HIV p24 Gag たんぱく質の発現をフローサイトメーターにて調べた。細胞内の CFSE は細胞が分裂するにつれ希釈されるので、蛍光強度を追うことで各細胞がどのくらい細胞分裂したのかを知ることができる。48 時間 LPS 刺激後の HIV マウス脾臓細胞では、p24 Gag たんぱく質の発現は細胞分裂を起こした細胞でのみ認められ、未分裂の細胞では認められなかった。この結果より、LPS 刺激による p24 Gag たんぱく質の発現には細胞周期の進行が重要であることが分かったので、次に細胞周期のどの段階が HIV-1 遺伝子の発現に重要なのかを調べた。HIV マウス脾臓細胞を LPS で刺激すると同時に、細胞周期の進行を各段階でとめる阻害剤を添加した結果、p24 Gag たんぱく質の発現は細胞周期をどの段階で停止させてもみられなくなった。以上の結果より、HIV マウス脾臓細胞における HIV-1 遺伝子活性化には、細胞周期の進行に依存した HIV-1 LTR の脱メチル化が関与している可能性が示唆された。

HIV-1 遺伝子の活性化が細胞周期の進行に依存していることがわかったので、先に示した LPS 刺激時の HIV-1 LTR における脱メチル化が、細胞分裂した細胞と未分裂の細胞で異なるかどうかを検討した。LPS 刺激後 48 時間の HIV マウス脾臓細胞を未分裂細胞と細胞分裂した細胞に分け、それぞれの細胞群の HIV-1 LTR における CpG 部位のメチル化状態を調べたところ、未分裂の細胞では HIV LTR にある 7ヶ所の CpG 部位全てがメチル化されていたのに対し、細胞分裂を起こした細胞では HIV LTR にある 7ヶ所の CpG のうち 5' 側から 2 番目の CpG 部位で弱く、5 番目の CpG 部位で強く脱メチル化されていた。脱メチル化されていた 2ヶ所の CpG 部位はどちらも、CREB/ATF 結合部位であることから、HIV マウス脾臓細胞における LPS 刺激後の HIV-1 遺伝子活性化には、細胞周期に依存した HIV-1 LTR 内にある CREB/ATF 結合部位の脱メチル化が関与していることが示唆された。

## 総括

以上の結果より、HIV マウス脾臓中の HIV-1 プロウイルスは通常 HIV-1 LTR にある CpG 部位全てがメチル化状態であるために不活性であるが、LPS 刺激を受けると TNF- $\alpha$ および IL-1 の誘導と、細胞周期の進行を介した HIV-1 LTR にある CREB/ATF 結合部位の脱メチル化により活性化状態に移行するという、新たな HIV-1 遺伝子再活性化機構の存在が *in vivo* で初めて示された。この研究成果は、AIDS 発症を抑制する新たな方法創出の一助になると期待される。